

85-052231/09 DAIICHI SEIYAKU KK 29.06.83-JP-118008 (16.01.85) A61k-31/60 A61k-47 B01j-13/02 C07k-15	B05 Liposome prepn. - by kneading mixt. of liposome membrane component and aq. soln. at above phase transition temp. and then stirring with aq. soln.	DAUC 29.06.83 *J6 0007-934-A 8(2-P2, 2-V, 3-L, 4-B1B, 4-B2D, 4-B4A, 4-C2, 10-C3, 12-G7, 12-M11) 10
C85-022709	Liposomes may be prep'd. by kneading a mixt. of a liposome membrane component (I) and an aqueous soln. (e.g. water, physiological saline, buffer soln., aq. soln. of sugars) at a temp. higher than the phase transition temp. ( $T_c$ ) (between lamella and the bimolecular phase) to give a hydrate of (I), and then stirring the latter together with a necessary amt. of aq. soln. at a temp. higher than $T_c$ .	applicable. Most lipids can be employed as (I).

USE

The liposomes can contain anti-tumour agents (e.g. cytosine arabinoside), antibiotics (e.g. penicillin G), proteins (e.g. insulin, interferon), polysaccharides, nucleic acids, vitamins, and other medicinals (e.g. Na salicylate).

ADVANTAGES

Organic solvents are not used. The process is simple and does not require special equipment or techniques. There is high retention of drugs making the process industrially

MEMBRANE COMPONENT

(I) include phospholipids (e.g. phosphatidyl-choline, -ethanolamine, -inositol, lysophosphatidyl-choline, sphingomyelin, yolk lecithin, soy lecithin, sugar lipids, dialkyl-type synthetic surfactants, and their mixtures.

In addition to these components, a membrane stabiliser such as sterols (e.g. cholesterol, cholestanol), charged material (e.g. dicetyl phosphate, phosphatidic acid, ganglioside, stearylamine) and anti-oxidant (e.g.  $\alpha$ -tocopherol) are pref. added.

EXAMPLE

Commercially available L- $\alpha$ -dimyristoylphosphatidyl-choline (L- $\alpha$ -DMPC, purity 98%,  $T_c = 23^\circ\text{C}$ ) (0.7g) was kneaded with 1 ml. 0.28M glucose aq. soln. warmed up to  $30^\circ\text{C}$ . This operation was repeated 3 times in order to thoroughly hydrate the phospholipid (the total aq. soln. was 4 ml.). Then, 46 ml. 0.28M glucose aq. soln. preliminarily warmed up to  $30^\circ\text{C}$  was added thereto and the mixt. stirred.

J60007934-

© 1985 DERWENT PUBLICATIONS LTD.  
128, Theobalds Road, London WC1X 8RP, England  
US Office: Derwent Inc. Suite 500, 6845 Elm St. McLean, VA 22101  
*Unauthorised copying of this abstract not permitted.*

The resulting soln. was stirred with a homomixer for 2 mins. at 30°C and cooled down to room temp. to give an opaline liposome suspension contg. glucose. The suspension (0.5 ml.) was filtered on Sephadex G-50 (RTM) to remove excess glucose not contained in the liposomes.

The glucose retention rate in the liposomes was 13.5%.  
(5ppW52LHDwgNo0/0).

J60007934-

© 1985 DERWENT PUBLICATIONS LTD.

128, Theobalds Road, London WC1X 8RP, England

US Office: Derwent Inc. Suite 500, 6845 Elm St. McLean, VA 22101

*Unauthorised copying of this abstract not permitted.*

## 11 公開特許公報 (A)

昭60-7934

⑤Int. Cl.  
B 01 J 13/02  
A 61 K 31/60  
47/00  
C 07 K 15/00

識別記号  
8317-4G  
7169-4C  
7043-4C  
6464-4H

④公開 昭和60年(1985)1月16日  
発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 5 頁)

## ④リボソームの製造方法

⑦発明者 菊池寛

東京都墨田区業平五丁目6番9

②特願 昭58-118008

号第一製薬中央研究所製剤研究

②出願 昭58(1983)6月29日

センター内

⑦発明者 広田貞雄

⑦出願人 第一製薬株式会社

東京都墨田区業平五丁目6番9

東京都中央区日本橋3丁目14番

号第一製薬中央研究所製剤研究

10号

センター内

## 明細書

## 1. 発明の名称

リボソームの製造方法

## 2. 特許請求の範囲

リボソーム膜成分物質を水性溶液と膜成分物質の相転移温度( $T_c$ )以上にて複合して水和させ、次に必要量の水性溶液を加えて $T_c$ 以上にて攪拌することを特徴とするリボソームの製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明はリボソームの製造方法に関する。

脂質の閉鎖小胞であるリボソームは、広く生体膜のモデルとしてその物理化学的諸性質の研究に利用されてきた。またリボソームはその内部に種々の薬剤を保持することが可能であるために、マイクロカプセルの一例として難経口吸収性薬剤の吸収促進、制癌剤等の細胞内皮系組織へのターゲッティング、免疫賦活剤等の活性増強等の応用研究が数多くなされている。リボソームがこれらの研究に盛んに用いられている

主な理由は、リボソームの膜構成成分自体が生体由来の脂質であるために毒性が少ないこと、生体の種々の膜との親和性が高いことなどが挙げられる。一方これらリボソームの調製法としては大部分膜成分物質である脂質の溶媒剤としてクロロホルム、エーテル、ベンゼン、エタノール、ヘキサン等を用いており、また脂質の可溶化剤としてコール酸、トライトンX-100及びその他の界面活性剤を用いている。従って前者の場合には有機溶媒を減圧、加温、不活性ガスのバーリング等により除去せねばならないし、最終製品中の残留溶媒が問題となる。またこれら調製方法をそのまま工業的生産に結びつけるには保安上及び安全作業上の問題の他、操作技術上の困難さ等がある。更に後者の場合には最終製品から透析またはゲル通過によって用いた界面活性剤を分離除去する必要がある。

有機溶媒あるいは界面活性剤等を用いずにリボソームを調製するものとしては、アニーリング法、凍結融解法の他、特開昭57-82310

号及び同57-82311号に示される凍結乾燥法などがある。アニーリング法では、リン脂質・水分散液をリン脂質の相転移温度( $T_c$ )以下にて超音波照射し、構造欠損(structural defect)を起こしたSUV(小さな一枚膜リボソーム)をいったん製し、その後に $T_c$ 以上でインキュベーションして融合させLUV(大きな一枚膜リボソーム)を調製する手法をとっている。凍結乾燥法では、大豆リン脂質に緩衝液を加え20~35°Cで20分間超音波照射してSUVをいったん製し、次にドライアイス-エタノールですばやく凍結し、更に室温に戻して融解させ、30°Cで軽く超音波照射して融合させることによりLUVを調製する手法をとっている。また凍結乾燥法ではリン脂質を水性溶媒中に分散させた後凍結乾燥し、これを水性溶媒中に再分散させることによりリボソームを製するものである。しかしながら、これ等の方法は再現性、装置及び操作上工業的製法として必ずしも満足しうるものではない。

発明者らはこれらの状況に鑑み、従来その有用性についてはあまり顧みられなかった有機溶媒を全く使用せずにリボソームを製する方法、即ちただ単に脂質を水性溶媒中に分散させる方法に注目し、その改良について鋭意検討した結果、リボソームを構成する通常の膜成分物質をまず少量の水性溶媒とともに膜成分物質の相転移温度( $T_c$ )以上にて練合して充分に水和させ次に必要量の水性溶媒を加えて $T_c$ 以上にて搅拌することにより、均一なリボソームを効率良くしかも大量に製することができるを見出しそれを本発明を完成するに至った。

本発明は膜成分物質を少量の水性溶媒とともに機械的に練合するため、水和が非常にすみやかに起こり、従って次に水性溶液を加えて $T_c$ 以上にて搅拌すると、膜成分物質はすでにラメラ相(2分子膜)状態であるため容易に閉鎖小胞を形成していくことになることを見い出したことに起因する。

本発明において使用される膜成分物質として

は、例えはホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン等に代表されるリン脂質の他の糖脂質、ジアルキル型合成界面活性剤等の一種又は二種以上の混合物が主体となる。なお、これに膜安定化剤としてコレステロール、コレスタン等のステロール類を、荷電物質としてジセチルホスフェート、ホスファチジン酸、ガングリオシド、ステアリルアミン等を、更に酸化防止剤としてグリコフェロール等を加えて膜成分物質を形成させてもよい。これらリボソームの膜成分物質の比率は何ら限定されるべきものではないが、好ましくは脂質1重量部に対しステロール類を0~2重量部程度、荷電物質を0.1重量部程度加えるのが適している。

また膜成分物質を分散させる水性溶媒としては、水、生理食塩水、緩衝液、糖類の水溶液及びこれらの混合液等が好ましく使用される。膜

成分物質との使用比率は膜成分物質1重量部に対し、始めの練合では0.2~8重量部程度、次の搅拌では10~1000重量部程度が適している。

本発明のリボソームに保持させる薬剤としては特に制限はないが、サイトシンアラビノシド、メトトレキセートに代表される制癌剤、ベニシリンGに代表される抗生素質、インシュリン、インターフェロン、グルコアミラーゼに代表されるたんぱく質、デキストランに代表される多糖類、DNA、RNAの如き核酸類、ビタミンAに代表されるビタミン類などの他サリチル酸ナトリウムのような一般薬剤が用いられ、一般にはこれ等は水性溶媒に溶解して用いる。

本発明にもとづいてリボソーム製剤を製するには以下の如き手順によれば良い。

まず所定量の膜成分物質をとり、これに少量の水性溶媒を加えて膜成分物質の $T_c$ 以上にてよく練合する。この時添加順序は何ら限定はされないが、本発明ではこの練合操作により膜成